

## **β<sub>2</sub>-Glycoprotein I IgM ELISA**

### Quantitativer Enzym-Immunoassay mit 96 Tests

Bestellnummer: **GPM02-96**

#### 1. VERWENDUNGSZWECK

Der BlueWell β<sub>2</sub>-Glycoprotein I IgM ELISA Kit ermöglicht den quantitativen Nachweis von IgM-Antikörper gegen β<sub>2</sub>-Glycoprotein I in menschlichem Serum.

#### 2. PRINZIP DES TESTS

Der BlueWell β<sub>2</sub>-Glycoprotein I IgM ELISA Kit ist ein Festphasen-Enzymimmunoassay mit 96 beschichteten, brechbaren, einzelnen Kavitäten und einem Peroxidase-TMB-Nachweissystem. Die Kavitäten sind mit hochspezifischen Antigenen beschichtet.

Im Testverlauf werden Serumproben 1:51 verdünnt und in den Kavitäten inkubiert. Humane Antikörper, falls vorhanden, binden an die spezifischen Antigene. Ungebundene oder überschüssige Antikörper werden durch Waschen entfernt. Anschließend werden HRP-konjugierte Kaninchenantikörper gegen humanes IgM in die Kavitäten pipettiert. Diese Enzym-Konjugat bindet an die Antigen-Antikörper-Komplexe. Nach einem zweiten Waschvorgang zum Entfernen des überschüssigen Konjugats wird die TMB/Substratlösung hinzugegeben. Die Aktivität des Enzyms, falls vorhanden, führt zu einer kolorimetrischen (blauen) Reaktion. Durch Zugabe verdünnter Säure wird die Reaktion gestoppt. In der Folge ändert sich die Farbe von blau zu gelb und kann bei 450 nm mit einem handelsüblichen Mikrotiterplattenanalyser bestimmt werden. Die Absorption (optische Dichte) ist direkt proportional zur Konzentration der IgM-Antikörper, die an die Antigene auf der Oberfläche der Kavitäten gebunden sind.

#### 3. KITINHALT

##### 3.1 Mitgelieferte Materialien

<b>Zum Verdünnen</b>	
<b>Waschpufferlösung 20x</b>	<b>1 Fläschchen, 50 ml - 20 x konzentriert (blau)</b> <i>enthält: Tris, Tween, Methylisothiazolon (Konservierungsmittel)</i>
<b>Gebrauchsfertig:</b>	
<b>Probenpuffer</b>	<b>1 Fläschchen, 50 ml (gelb)</b> <i>enthält: Tris, Tween, BSA, Methylisothiazolon (Konservierungsmittel)</i>
<b>Substrat</b>	<b>1 Fläschchen, 20 ml (farblos)</b> <i>enthält: Stabilisiertes TMB/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Methylisothiazolon (Konservierungsmittel)</i>
<b>Negativkontrolle</b>	<b>1 Fläschchen, 1 ml (grün)</b> <i>enthält: Humanes Serum (verdünnt), Methylisothiazolon (Konservierungsmittel)</i>
<b>Kalibratoren</b>	<b>6 Fläschchen, je 1 ml: 0, 25, 50, 100, 200, 400 U/ml.</b> <b>(Farbe wird mit steigender Konzentration stärker)</b> <i>enthält: Humanes Serum (verdünnt), Methylisothiazolon (Konservierungsmittel)</i>
<b>Positivkontrolle</b>	<b>1 Fläschchen, 1 ml (blau)</b> <i>enthält: Humanes Serum (verdünnt), Methylisothiazolon (Konservierungsmittel)</i>
<b>Konjugat</b>	<b>1 Fläschchen, 20 ml (blau)</b> <i>enthält: anti-humanes IgM aus Kaninchen markiert mit Peroxidase, Methylisothiazolon (Konservierungsmittel)</i>
<b>Stopplösung</b>	<b>1 Fläschchen, 20 ml (farblos)</b> <i>enthält: Schwefelsäure 2.5 %</i>
<b>Mikrowellstreifen</b>	<b>12 x 8 Kavitäten (brechbar)</b> <i>beschichtet mit gereinigtem β<sub>2</sub>-Glycoprotein I (human)</i>
<b>Halter für die Streifen</b>	<b>1</b>

##### 3.2 Erforderliche, nicht mitgelieferte Materialien

- Microtiterplatten Lesegerät (450 nm Ablesefilter + optionaler 650 nm Referenzfilter)).
- Glasgeräte, Teströhrchen zur Verdünnung.
- Destilliertes Wasser.

- Präzisionspipetten (10, 100, 200, 500, 1000 µl) oder Multipipette.
- Wascheinrichtung für Mikrotiterplatte (Mehrkanalpipette oder automatisches System)
- Zellstoff

#### 4. LAGERUNG UND HALTBARKEIT

- Bewahren Sie alle Reagenzien und Platten bei 2 - 8 °C auf.
- Nach dem Ansetzen (siehe 7.2) ist die Waschlösung mindestens einen Monat bei 4 °C stabil.
- Reagenzien und Kavitäten sollten nur bis zum Haltbarkeitsdatum, das auf jeder Komponente angegeben ist, verwendet werden.

#### 5. VORSICHTSMAßNAHMEN

##### 5.1 Angaben zur Gesundheitsschädlichkeit

DIESES PRODUKT IST NUR FÜR "IN VITRO" DIAGNOSTISCHE ZWECKE BESTIMMT UND DARF NUR VON FACHPERSONAL VERWENDET WERDEN.

Obwohl dieses Produkt bei normalem Gebrauch nicht als giftig oder gefährlich eingestuft ist, beachten Sie bitte die folgenden Empfehlungen und Vorsichtsmaßnahmen um ein Höchstmaß an Sicherheit zu gewährleisten:

- Der Kit enthält potenziell schädliche Komponenten, der Kontakt mit Haut und Augen ist daher zu vermeiden da die Reagenzien möglicherweise zu Reizungen führen können. Beim Umgang mit dem Kit nicht rauchen, essen oder trinken.
- Alle in diesem Set verwendeten humanen Ausgangsprodukte, verwendet z.B. in Kontrollen oder Kalibratoren, wurden auf Antikörper gegen HbsAg, Hepatitis C sowie HIV 1 und 2 getestet und für negativ befunden. Allerdings kann derzeit kein Test garantieren, dass tatsächlich keinerlei virale Bestandteile in diesen Materialien vorhanden sind. Behandeln Sie daher Kontrollen, Kalibratoren und Patientenproben in diesem Kit so als ob sie potentiell infektiös wären.

##### 5.2 Sonstige Vorsichtsmaßnahmen

- Reagenzien oder Kavitäten mit verschiedenen Chargennummern sollten weder gemischt noch untereinander ausgetauscht werden. Dies kann zu Abweichungen in den Resultaten führen.
- Bringen Sie alle Komponenten vor dem Gebrauch auf Zimmertemperatur (18 - 24 °C) und folgen Sie dem empfohlenen Inkubationsablauf für optimale Testergebnisse.
- Entnehmen Sie die Reagenzien stets mit einer sauberen Pipettenspitze, um Verunreinigungen durch Fremdstoffen zu vermeiden.
- Schützen Sie das Chromogen/Substratreagenz vor Licht, um eine Erhöhung der Leerwerte und des Hintergrundsignals zu vermeiden.

#### 6. ENTNAHME, HANDHABUNG UND LAGERUNG DER PROBEN

- Verwenden Sie vorzugsweise frisch entnommene Serumproben.
- Ikterische, lipämische, hämolytische oder bakteriell kontaminierte Serumproben dürfen nicht verwendet werden.
- Mit Partikeln verunreinigte, trübe Seren sollten durch langsames Zentrifugieren gereinigt werden.
- Nach der Abtrennung sollten die Serumproben unverzüglich verwendet werden. Andernfalls sind sie sofort aufzuteilen und können dann einige Tage bei 2 - 8 °C bzw. eingefroren bei - 20 °C auch über einen längeren Zeitraum gelagert werden. Vermeiden Sie wiederholtes Auftauen und wieder Einfrieren.

#### 7. TESTVERFAHREN

##### 7.1 Proben

- Serumproben **1:51** mit Probenpuffer (gebrauchsfertig) verdünnen.  
→ z. B. **500 µl** Probenpuffer + **10 µl** Serum. Mischen.

##### 7.2 Waschpufferlösung

- Konzentrierte Waschpufferlösung **1:20** mit destilliertem Wasser verdünnen.

**Manuelles Waschen:** 10 ml fertige Lösung für 8 Kavitäten oder 120 ml für 96 Kavitäten.

→ z. B. 9.5 ml Wasser + 0.5 ml Puffer. Mischen.

**Automatisches Waschen:** Berücksichtigen Sie eine zusätzliche Menge beim Ansetzen der Lösung für die Instrumenteneinrichtung und für das Totvolumen des Automaten.

### 7.3 Kavitäten

- Berechnen Sie die Anzahl der für den Ansatz erforderlichen Kavitäten. Nicht verwendete Kavitäten aus dem Halter nehmen und im mitgelieferten Kunststoffbeutel fest verschlossen aufbewahren.

### 7.4 Pipettierschema

- Vergewissern Sie sich, dass alle Reagenzien vor dem Gebrauch Zimmertemperatur (18 - 24 °C) erreicht haben)

- **100 µl verdünntes Patientenserum** in die vorgesehenen Kavitäten **pipettieren**.
- **100 µl Kalibratoren und Kontrollen** in die vorgesehenen Kavitäten **pipettieren**.
- **30 Minuten Inkubieren** bei Zimmertemperatur (18 - 24 °C)
- **3 x Waschen mit 200 µl Waschpufferlösung (1:10 verdünnt)**
- **100 µl Konjugat** in jede Kavität **pipettieren**.
- **30 Minuten Inkubieren** bei Zimmertemperatur (18 - 24 °C)
- **3 x Waschen** mit je **200 µl Waschpufferlösung (1:10 verdünnt)**
- **100 µl Substrat** in jede Kavität **pipettieren**.
- **10 Minuten Inkubieren** im Dunkeln bei Zimmertemperatur (18 - 24 °C)
- **100 µl Stopplösung** in jede Kavität **pipettieren**  
(In derselben Reihenfolge wie das Substrat um einen Shifteffekt zu vermeiden)
- **Ablezen der Absorption** bei **450 nm** (oder 450/650 nm) **innerhalb von 30 Minuten**

*Hinweis: Wir empfehlen, bei jedem Lauf einen Leerwert in Doppelbestimmung anzusetzen (2 Kavitäten mit Probenpuffer statt Patientenprobe pipettieren).*

### Manuelles Waschen

Dekantieren Sie die Flüssigkeit durch schnelles Umdrehen der Mikrotiterplatte. Klopfen Sie die Mikrotiterplatte mit den Kavitäten nach unten fest auf sauberen Zellstoff. Pipettieren Sie 200 µl verdünnte Waschpufferlösung in jede Kavität, warten Sie 20 Sekunden und wiederholen Sie das Dekantieren und Abklopfen. Wiederholen Sie diesen Vorgang noch zweimal.

## 8. ERMITTLUNG UND AUSWERTUNG DER RESULTATE

### 8.1 Quantitative Auswertung

Erstellen Sie eine Standardkurve in dem Sie die optische Intensität jedes Kalibrators unter Berücksichtigung der jeweiligen Einheiten eintragen. Für optimale Resultate empfehlen wir den Lin/Lin-Algorithmus. Lesen Sie mit Hilfe der optischen Dichte jeder Probe die entsprechenden Antikörperkonzentrationen in Einheiten/ml ab.

**Normalbereich: IgG ≤ 25 U/ml**

AUSWERTUNG	Negatives Resultat	Positives Resultat
	< 25 Einheiten/ml	> 25 Einheiten/ml

*Hinweis: Grenzwertige Proben sollten erneut getestet werden.*

### 8.2 Semi-quantitative Auswertung

Eine semi-quantitative Auswertung der Resultate kann mit dem **25 Einheiten/ml**-Kalibrator als Grenzwertkontrolle vorgenommen werden. Die Resultate werden als **Bindungsindex** angegeben, dem Verhältnis zwischen der optischen Dichte (O.D.) der Probe und der Grenzwertkontrolle:

$$\text{B.I.} = \text{O.D. der Probe} / \text{O.D. der Grenzwertkontrolle}$$

Eine Probe ist **negativ**, wenn **B.I. ≤ 1,0**

Eine Probe ist **positiv**, wenn **B.I. > 1,0**

*Hinweis: Grenzwertige Proben sollten erneut getestet werden.*

### 8.3 Validierung der Resultate

Ein Testdurchlauf gilt als valide, wenn die nachfolgenden Qualitätsanforderungen erfüllt sind. Falls nicht überprüfen Sie den gesamten Verfahrensablauf und wiederholen Sie den Test siehe § 11. Falls das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den Hersteller bzw. Händler für Abhilfe.

	Qualitätskriterien	
	Optische Dichte	Einheiten/ml
<b>Leerwert (Probenpuffer)</b>	< 0,100	-
<b>Negative Kontrolle</b>	-	≤ 20
<b>25 Einheiten/ml Kalibrator</b>	< 50% des 400 Einheiten/ml Kalibratoren	-
<b>Positive Kontrolle</b>	> 0,800	200 - 400

## 9. TESTCHARAKTERISTIK

### 9.1 Linearität

Ausgewählte Seren wurden mit diesem Kit getestet und verdünnten linear. Aufgrund der heterogenen Eigenschaften humaner Autoantikörper ist es jedoch nicht auszuschließen, dass einzelne Proben dieser Regel nicht folgen. Detaillierte und aktualisierte Angaben sind auf Anfrage erhältlich.

### 9.2 Reproduzierbarkeit

Drei Kontrollseren (hoch, mittel, niedrig) wurden in statistisch relevanten Wiederholungen auf Varianzen innerhalb eines Tests und zwischen verschiedenen Kits und Chargen geprüft. Die Variationskoeffizienten wurden mit <10 % innerhalb eines Ansatzes bzw. <20 % innerhalb einzelner Chargen und Ansätze gefunden. Detaillierte und aktualisierte Angaben sind auf Anfrage erhältlich.

### 9.3 Klinische Sensitivität und Spezifität

Die Sensitivität wurde mit > 99 % ermittelt

Die Spezifität wurde mit > 99 % ermittelt

Die Sensitivität wurde anhand klinisch definierter Bevölkerungsgruppen (positiver Befund mit krankheitsspezifischen Vergleichsmethoden bestätigt) festgestellt. Die Spezifität wurde anhand von Kontrollgruppen geprüft, die einen Querschnitt der normal gesunden Bevölkerung darstellten sowie anhand klinisch definierter Kontrollgruppen. Nähere Angaben sind auf Anfrage erhältlich.

### 9.4 Grenzwerte / Cut-off

Das erwartete Ergebnis für normale Patienten ist negativ. Die Anzahl der positiven Resultate und der Grad der Positivität hängt von Parametern wie der Auswahl der Testpersonen, deren Behandlungsstand und weiteren Faktoren ab. Jedes Labor sollte daher auf Grundlage der üblicherweise anfallenden Seren seine eigenen Grenzwerte festlegen.

## 10. TESTBESCHRÄNKUNGEN

1. Eine Diagnose sollte keinesfalls ausschließlich auf Grundlage der Ergebnisse dieses Tests erfolgen.
2. Die Testergebnisse sollten immer in Verbindung mit einer vollständigen klinischen Bewertung und den Resultaten anderer diagnostischer Verfahren beurteilt werden.
3. D-tek und seine Verteiler sind nicht haftbar, weder direkt, indirekt noch konsequent, für Schäden die aufgrund unerlaubter Änderungen im Arbeitsverlauf entstanden sind. Der Kit soll nur von geschultem Laborpersonal durchgeführt werden.
4. Die Grundsätze der GLP («Gute Labor Praxis») sollten durchgehend angewendet werden.

## 11. BEHEBUNG EINFACHER PROBLEME

Optische Intensität zu niedrig	Optische Intensität zu hoch
<p>Bitte prüfen Sie folgende Möglichkeiten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Geeigneter Filter für das Lesegerät (nur 450 nm oder 450/650 nm)</li> <li>• Richtige Verdünnung der Waschpuffer-lösung (mögl. zu schwach verdünnt)</li> <li>• Richtige Verdünnung der Proben (mögl. zu stark verdünnt)</li> <li>• Inaktives Konjugat (durch Kontamination mit Fremdstoffen usw.)</li> </ul> <p>Nur saubere Pipettenspitzen verwenden. Manche älteren Pipettierautomaten verwenden Stahlpipetten diese geben Metallionen ab, die das Konjugat auf Dauer inaktivieren.</p>	<p>Bitte prüfen Sie folgende Möglichkeiten:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Ungenügendes Waschen (siehe Verfahren zum manuellen Waschen unter 7.4)</li> <li>• Zu lange Inkubationszeit oder zu hohe Temperatur?</li> <li>• Richtige Verdünnung der Proben (mögl. zu schwach verdünnt)?</li> <li>• Verunreinigung der Substratreagenzien (mit Konjugat usw. → Farbe bereits in der Flasche sichtbar blau)? Nur saubere Pipettenspitzen verwenden.</li> <li>• Verunreinigung der Proben (mit Mikroorganismen usw.) Verwenden Sie möglichst frische Proben.</li> </ul>

## 12. BIBLIOGRAPHIE

Aktuelle Literatur erhalten Sie auf Anfrage. Bitte wenden Sie sich an [info@d-tek.be](mailto:info@d-tek.be)